

中国药典、欧洲药典和 WHO 草案甲、乙型肝炎 疫苗质量控制标准与方法的比较^{*}

何鹏¹ 洪小栩² 郭中平² 胡忠玉^{1**} 梁争论¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 国家药典委员会, 北京 100061)

摘要: 分析 2010 年版中国药典甲、乙肝疫苗标准部分修订及新增内容, 并与欧洲药典 6.0 版甲、乙肝疫苗标准(以下简称欧洲药典)和 WHO 2010 年生物制品标准化专家会议“确保重组乙肝疫苗质量、安全性、效力的建议”草案(以下简称 WHO 草案)比较。2010 年版中国药典甲、乙肝疫苗部分在生产工艺、质量标准、产品稳定性等方面的标准要求较 2005 年版中国药典有较大的提高, 对于残留有害物质的控制进一步加强; 欧洲药典和 WHO 草案对疫苗原液的比活提出了明确要求, 对乙肝疫苗要求进行糖、脂成分测定。在今后药典的标准提高方面, 应加强疫苗产品的比活及糖、脂质等方面标准和方法的研究, 制定相应标准, 保证疫苗的质量。

关键词: 药典; 甲型肝炎; 乙型肝炎; 疫苗; 国际标准; 方法比较

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)10-1996-05

Comparison of standards and methods for the quality control of hepatitis A and hepatitis B vaccines in Chinese Pharmacopoeia , European Pharmacopoeia and WHO Draft^{*}

HE Peng¹ , Hong Xiao-xu² , Guo Zhong-ping² ,
HU Zhong-yu^{1**} , LIANG Zheng-lun¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products , Beijing 100050 , China;

2. Chinese Pharmacopoeia Commission , Beijing 100061 , China)

Abstract: Amendments on the standards of hepatitis A and hepatitis B vaccines in Chinese pharmacopoeia (ChP) 2010 edition were analyzed and compared with corresponding parts in European pharmacopoeia (EP) version 6.0 and WHO Draft of Recommendations to Assure the Quality , Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines for Expert Committee on Biological Standardization (WHO Draft) . Major improvements were introduced on the standards of hepatitis A and hepatitis B vaccines for manufacturing process , specifications , stability of products. Controlling of residual hazardous substances was strengthened. Specific requirements on relative activity of bulk were listed in EP and WHO Draft. Tests for the contents of carbohydrates and lipids were required for hepatitis B vaccine. In the future , researches on the standards and methods of relative activity and the contents of carbohydrates and lipids should be strengthened in the improvements on the standards of ChP to insure the qualities of vaccine.

Key words: pharmacopoeia; hepatitis A; hepatitis B; vaccine; international standard; method comparison

病毒性肝炎是我国严重的公共卫生问题之一, 国家在“十一五”科技重大专项中将病毒性肝炎的防治列为重点内容进行攻关。甲型肝炎(甲肝)疫苗也于 2006 年列入儿童计划免疫; 卫生部于 2006 年开始对儿童和青少年进行乙型肝炎(乙肝)疫苗查漏补种, 力争降低我国病毒性肝炎的疾病负担。

我国甲、乙肝疫苗的生产厂家和批签发量均具世界前列, 疫苗品种也最为丰富, 其中甲肝减毒活疫苗、乙肝 CHO 疫苗(S 蛋白)为我国独有品种。2009 年我国批签发甲肝疫苗共 2726 万剂; 乙肝疫苗 5595 万剂; 甲乙肝联合疫苗 61 万剂。不断完善和提高我国甲、乙肝疫苗的质量标准对保证实现我国的肝炎

* 国家“十一五”重大专项课题资助(NO 2009ZX10004-802)

** 通讯作者 Tel: (010) 67095798; E-mail: huzy67@163.com

疫苗计划免疫目标具有重要意义。总结 2010 年版药典甲、乙肝疫苗部分修订、新增内容,提出我国 2015 年版中国药典甲、乙肝疫苗质量标准提高的思路具有重要意义。本文通过分析 2010 年版中国药典甲、乙肝疫苗标准修订的主要内容,比较新版中国药典与新版欧洲药典、WHO 新的指南草案中甲、乙肝疫苗相关标准,提出下一步标准提高的思路。

1 新版中国药典与 2005 年版中国药典的比较

1.1 修订品种: 重组酿酒酵母乙肝疫苗; 重组 CHO 细胞乙肝疫苗; 减毒甲肝疫苗

1.1.1 乙肝疫苗 与 2005 年版中国药典^[1]相比, 2010 年版中国药典^[2]在乙肝疫苗的种子批要求方

面,新增了目的基因核酸序列检测、活菌率、抗原表达率(酵母疫苗)、目的蛋白鉴别(CHO 疫苗)等项目,明确了对于细胞染色体检查的要求(CHO 疫苗),进一步保证了疫苗表达系统的遗传稳定性和质量稳定性;在生产工艺中,增加了原液氨基酸序列、培养物和原液保存时间、点配置方面的要求,对保证疫苗质量的稳定性具有重要意义;为保证疫苗的安全性,在 CHO 疫苗的原液与半成品指标中新增了细菌内毒素检定项目,酿酒酵母疫苗半成品、成品的细菌内毒素标准由 $<10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提高到 $<5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$;对于工艺中使用了抗生素的疫苗,在成品指标中增加了抗生素残留检定项目(表 1 2)。

表 1 2010 年版与 2005 年版中国药典(酿酒酵母与 CHO)乙肝疫苗项目比较

Tab 1 Comparison of specifications for hepatitis B vaccines (*Saccharomyces cerevisiae* and CHO) in 2010 edition and 2005 edition of ChP

分类 (classification)	酿酒酵母疫苗(<i>Saccharomyces cerevisiae</i> vaccine)			CHO 疫苗(CHO vaccine)			目的 (objective)
	项目 (test)	2005 版 (2005 edition)	2010 版 (2010 edition)	项目 (test)	2005 版 (2005 edition)	2010 版 (2010 edition)	
种子批要求 (requirements for seed lot)	核酸序列要求(nucleic acid sequence)	无(not specified)	与原始批一致(consistent with original lot)	/	/	/	遗传稳定性(genetic stability)
	活菌率(viable rate)	无(not specified)	不低于 50% (not less than 50%)	/	/	/	质量稳定性(quality stab)
	抗原表达率(antigen expression rate)	无(not specified)	不低于 0.5% (not less than 0.5%)	/	/	/	质量稳定性(quality stability)
	/	/	/	细胞染色体(cell chromosome)	不明确(indefinite)	明确(definite)	遗传稳定性(genetic stability)
	/	/	/	目的蛋白鉴别(identification of target protein)	无(not specified)	有(specified)	表达稳定性(expression stability)
生产工艺 (manufacturing process)	原液氨基酸序列(amino acid sequence of bulk)	无(not specified)	与原始批一致(consistent with original lot)	原液氨基酸序列(amino acid sequence of bulk)	无(not specified)	与原始批一致(consistent with original lot)	工艺、质量稳定性(stability of process and quality)
	培养物和原液保存时间(storage time of inoculum and bulk)	无(企业自行规定)(not specified up to manufacturer)	小于 3 个月(less than 3 months)	纯化产物保存时间(storage time of purified product)	无(not specified)	小于 3 个月(less than 3 months)	质量稳定性(quality stability)
	点配置(preparation of final product)	无(not specified)	要求(specified)	点配置(收获次数)(preparation of final product /harvest times)	无(not specified)	要求(specified)	成品抗原量准确性(accuracy of antigen content in final product)
	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	无(not specified)	$<5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	无(not specified)	$<10 \text{ EU}/10 \mu\text{g}$ 蛋白($<10 \text{ EU per } 10 \mu\text{g protein}$)	减少不良反应(reduce adverse reaction)
半成品指标(test for final bulk)	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	$<10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$<5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	无(not specified)	$<10 \text{ EU}/10 \mu\text{g}$ 蛋白($<10 \text{ EU per } 10 \mu\text{g protein}$)	减少不良反应(reduce adverse reaction)
成品指标(test for final product)	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	$<10 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	$<5 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$	细菌内毒素(bacterial endotoxin)	$<10 \text{ EU}/\text{剂}$ ($<10 \text{ EU per dose}$)	$<10 \text{ EU}/\text{剂}$ ($<10 \text{ EU per dose}$)	减少不良反应(reduce adverse reaction)
	/	/	/	抗生素残留(residual antibiotics)	无(not specified)	$<50 \text{ ng} \cdot \text{剂}^{-1}$ ($<50 \text{ ng per dose}$)	减少不良反应(reduce adverse reaction)
	硫柳汞(thiomersal)	$30 - 70 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	无(not specified)	硫柳汞(thiomersal)	$<100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$<60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	减少有害物质(reduce hazardous substances)

1.1.2 甲肝疫苗 2010 年版中国药典在甲肝疫苗的种子批要求中增加了对生产的疫苗病毒代次的规定; 生产工艺中增加了病毒接种和培养、病毒收获、点配置的要求; 在收获液检定中增加了病毒滴定、无

菌检查、支原体检查项目的要求; 在成品指标中增加了抗生素残留检定项目, 且三氯甲烷与热稳定项目的标准有了进一步提高, 起到了保证疫苗生产的一致性、安全性及有效性的作用。

表 2 2010 年版与 2005 年版中国药典甲肝减毒活疫苗比较
Tab 2 Comparison of specifications for hepatitis A (live) vaccine in 2010 edition and 2005 edition of ChP

分类 (classification)	项目 (test)	2005 年版 (2005 edition)	2010 年版 (2010 edition)	目的 (objective)
种子批要求(requirements for seed lot)	生产疫苗用病毒代次(virus passage for vaccine production)	无(not specified)	规定(specified)	产品一致性(product consistency)
生 产 工 艺 (production process)	病毒接种和培养(inoculation and incubation of virus)	无(not specified)	0.05 – 1.0MOI 接种(inoculate at 0.05 – 1.0MOI)	工艺稳定性(stability of process)
	病毒收获(harvesting of virus)	无(not specified)	增加收获物保存条件/病毒提取(specify storage condition of harvest/virus extraction)	规范工艺(process standardization)
	点配置(preparation of final product)	无(not specified)	按规定的同一滴度进行配制(prepare according to same titer specified)	成品抗原量准确(accuracy of antigen content in final product)
收获液检定(test for harvest)	病毒滴定(virus titration)	无(not specified)	不低于 7.00lgCCID ₅₀ • mL ⁻¹ (not less than 7.00lgCCID ₅₀ • mL ⁻¹)	保证疫苗质量(ensure vaccine quality)
	无菌检查(test for sterility)	无(not specified)	应符合规定(pass)	保证疫苗质量(ensure vaccine quality)
	支原体检查(test for mycoplasma)	无(not specified)	应符合规定(pass)	保证疫苗质量(ensure vaccine quality)
成品指标(parameter of final product)	三氯甲烷(chloroform)	半成品不高于 0.1% (not more than 0.1% in final bulk)	成品不高于 0.006% (not more than 0.006% in final product)	减少有害物质(reduce hazardous substances)
	抗生素(antibiotics)	无(not specified)	50 ng/剂(50 ng per dose)	减少不良反应(reduce adverse reaction)
	热稳定(heat stability)	仅有滴度下降要求(only reduction of titer was specified)	滴度及滴度下降要求双通过(titer and reduction of titer are both specified)	保证免疫效果(insure immunization effect)

1.2 新增品种和项目 2010 年版中国药典甲、乙肝疫苗方面新增了重组汉逊酵母乙肝疫苗、灭活甲肝疫苗、甲乙肝联合疫苗等品种, 对上述品种的要求除符合凡例外, 在相应甲、乙肝疫苗相应品种各论中列出了具体标准; 在灭活甲肝疫苗附录中新增了附录 1 “去氧胆酸钠残留量测定法”和附录 2 “2 – 苯氧乙醇含量测定法”。

2 新版中国药典与欧洲药典和 WHO 草案的比较

2.1 乙肝疫苗 2010 年版中国药典中, 乙肝疫苗依据其表达系统分别在不同的各论中进行描述, 包括酿酒酵母乙肝疫苗、汉逊酵母乙肝疫苗、CHO 细胞乙肝疫苗, 而欧洲药典^[3]和 WHO 草案^[4]则将不

同来源的乙肝疫苗在单一的乙肝疫苗各论中统一描述。

2010 年版中国药典依据目前国内乙肝疫苗目的蛋白仅为 S 蛋白的状况进行品种描述, 而欧洲药典因市场中涵盖 S、前 S 制品, 规定目的蛋白除 S 蛋白(主蛋白) 外, 尚包括中蛋白(S 基因和前 S – 2 基因产物) 和大蛋白(S 基因、前 S – 1 基因和前 S – 2 基因产物), WHO 草案针对市场中乙肝疫苗品种规定目的蛋白可以为 S 基因或 S 基因 + 前 S 基因的产物; 欧洲药典和 WHO 草案对疫苗原液的比活、制品中的脂质和糖的含量作了相关规定, 而 2010 年版中国药典则未作要求; 欧洲药典、WHO 草案中规定可

选择使用体内法或体外法测定疫苗效力,而 2010 年版中国药典对于酵母疫苗和 CHO 疫苗分别作了要求。此外,欧洲药典中要求抗原纯度测定方法的敏感度达到 1% 的水平,而 2010 年版中国药典则未作

要求,但要求在建立检定方法时作适用性研究。WHO 草案提出了单一收获物的概念,要求对其所含外源因子加以控制,2010 年版中国药典、欧洲药典对于单一收获物则无具体要求。

表 3 2010 年版中国药典与欧洲药典、WHO 草案乙肝疫苗项目比较

Tab 3 Comparison of specifications for hepatitis B vaccines in 2010 edition of ChP, EP and WHO draft

分类 (classification)	2010 年版中国药典 (2010 edition of ChP)	欧洲药典 (EP)	WHO 草案 (WHO draft)
生产用菌种和细胞 (bacteria and cell strains for production)	明确酿酒酵母、汉逊酵母和 CHO 细胞 3 个表达系统 (three expression systems [saccharomuces cerevisiae, hansenula polymorpha and CHO cell] are specified respectively)	酵母(酿酒酵母)或哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或其他合适的细胞株)(yeast [saccharomuces cerevisiae] or mammalian cells [Chinese hamster ovary cell or other suitable cell lines])	酿酒酵母、汉逊酵母、毕赤酵母和 CHO 细胞 4 个表达系统 (four expression systems [saccharomuces cerevisiae, hansenula polymorpha, pichia pastoris and CHO cell])
目的蛋白(target protein)	S 蛋白(S protein)	本疫苗含病毒 S 基因产物,或者病毒 S 基因和前 S-2 基因产物,或者病毒 S 基因、前 S-1 基因和前 S-2 基因产物 (the product of the S gene, a combination of the S gene and pre-S2 gene products or a combination of the S gene, the pre-S2 and pre-S1 gene products)	病毒 S 基因产物,或 S 基因/前 S 基因联合产物 (the product of the S gene or a combination of the S gene and pre-S gene products)
疫苗原液的比活要求 (requirements for the relative activity of bulk)	无(个别企业内控标准有)(not specified, some manufactures may specify for their internal standards)	抗原/蛋白比值应在特定制品的指定限度内 (the antigen/protein ratio is within the limits approved for the specific product)	表面抗原/蛋白比值应符合药品监管部门的要求 (the antigen/protein ratio should comply with requirements of NRA)
脂质、核酸及糖等组分的含量测定 (test for lipid, nucleic acids and carbohydrate)	测定 DNA 残留量,应不高于 10pg/剂 (CHO 疫苗) (residual DNA in CHO vaccine should be not more than 10pg/dose)	应测定制品中的脂质、核酸及糖等组分的含量 (the content of lipids, nucleic acids and carbohydrates should be determined)	脂质、糖的含量及 DNA 残留量应符合药品监管部门的要求;批签发时可豁免 (the content of lipids, carbohydrates and nucleic acids should meet the requirements of NRA and test may be omitted at lot release)
参考品的要求 (requirements for reference)	体内效力参考品 (CHO 疫苗) (references for in vivo potency test of CHO vaccine), 体外效力参考品 (酿酒酵母、汉逊酵母) (references for in vitro potency test of saccharomuces cerevisiae and hansenula polymorpha vaccine)	参考疫苗的动物免疫原性应不低于普通疫苗 (产生的抗体水平 $\geq 10 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 者应不低于 95%) (animal immunogenicity of reference vaccine should be not less than ordinary vaccine [subjects with antibody level $\geq 10 \text{ mIU} \cdot \text{mL}^{-1}$ should be not less than 95%])	可使用产品特异性参考品,由厂家自行研制,经 NRA 批准 (product specific reference produced by manufacture and approved by NRA may be used)
效力试验 (potency test)	体内法 (CHO 疫苗) (in vivo assay [CHO vaccine]), 体外法 (酿酒酵母、汉逊酵母) (in vitro assay [saccharomuces cerevisiae and hansenula polymorpha])	体内法或体外法 (in vivo assay or in vitro assay)	体内法或体外法 (in vivo assay or in vitro assay)
抗原纯度测定方法的敏感度及纯度要求 (the sensitivity of methods for antigen purity test and requirements for purity)	无敏感度要求;纯度 $\geq 95\%$ (CHO 疫苗), $\geq 99\%$ (酿酒酵母、汉逊酵母) (sensitivity of method not specified; purity should be $\geq 95\%$ for CHO vaccine and $\geq 99\%$ for saccharomuces cerevisiae and hansenula polymorpha vaccine)	应足以检测出总蛋白中可能存在的 1% 的污染物;纯度不低于 95% (enough to detect a potential contaminant at a concentration of 1 percent of total protein; purity should be not less than 95%)	无敏感度要求;纯度 $\geq 95\%$ (sensitivity of method not specified; purity should be $\geq 95\%$)
单一收获物 (single harvest)	无具体要求 (not specified)	无具体要求 (not specified)	应测定外源因子 (外源微生物) (test for extraneous agents [extraneous micro-organisms])
异常毒性测定 (abnormal toxicity test)	要求 (specified) 无 (not specified)	批签发时可免除 (may be omitted at lot release)	

2.2 甲肝疫苗 由于甲肝减毒活疫苗为我国独有, 因此与欧洲药典的比较主要为灭活甲肝疫苗标准方面。

在生产用细胞方面, 2010 年版中国药典依据国内制品状况而规定了其品种, 欧洲药典因制品状况,

允许使用的范围较为宽泛; 2010 年版中国药典对于病毒滴度与抗原含量比例、疫苗原液的比活、核酸含量测定、参考品均未作要求, 而欧洲药典对于以上项目则作了相应规定。

表 4 2010 年版中国药典与欧洲药典甲肝疫苗项目比较
Tab 4 Comparison of specifications for hepatitis A vaccines in 2010 edition of ChP and EP

分类 (classification)	2010 年版中国药典 (2010 edition of ChP)	欧洲药典 (EP)
生产用细胞(cell lines for production)	生产用细胞为人二倍体细胞(using human diploid cell line for production)	病毒可在二倍体细胞或经国家主管部门批准的传代细胞系中增殖(virus can be propagated in a human diploid cell line or in a continuous cell line approved by NRA)
病毒滴度与抗原含量比例(ratio of virus titer to antigen content)	无(not specified)	通过适量的单一收获物验证感染性病毒滴度与抗原含量比值的一致性(verify consistency of the ratio of infective virus titer and antigen content through appropriate amount of single harvest)
疫苗原液的比活要求(requirements for relative activity of vaccine bulk)	无(not specified)	甲肝抗原含量与总蛋白的比值应在批准的限度之内(ratio of HAV antigen content to total protein should be within approved range)
核酸含量测定(test for nucleic acid content)	无(not specified)	传代细胞系残留宿主细胞 DNA 应不高于 100pg/剂(residual host - cell DNA should be not more than 100pg per dose in continuous cell lines)
参考品的要求(requirements for reference)	无(not specified)	参考疫苗全程基础免疫后, 血清阳转率应不低于 95% (ELISA 法测定, 抗体水平 ≥ 20 mIU/ml) (reference should produce not less than 95% seroconversion after full - course primary immunization [antibody level ≥ 20 mIU \cdot mL ⁻¹ tested by ELISA])

3 总结

2010 年版中国药典甲、乙肝疫苗各论与 2005 年版中国药典相比较, 在疫苗毒株(菌株) 的遗传稳定性和生产一致性方面增加了质控标准; 通过 MOI 和点配置等的设定保证了疫苗质量和剂量的稳定, 提高了细菌内毒素、防腐剂的标准, 新增了成品中检测抗生素的要求, 为减少疫苗接种后不良反应提供了基础, 有利于甲、乙肝疫苗的质量可控以及安全和有效。通过与新版欧洲药典和 WHO 草案的比较, 今后甲、乙肝疫苗的标准提高应着重于疫苗纯度和杂质检测方法的进一步完善, 同时应借鉴国际及国

内其他制品的先进技术和经验, 不断提升疫苗的质量控制水平。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. Vol III(三部): 115
2 ChP(中国药典). 2010. Vol III(三部): 119
3 EP. 6. 0. 232
4 Morag Ferguson, Potters Bar, Maria Baca - Estrada *et al.* Recommendations to Assure the Quality, Safety and Efficacy of Recombinant Hepatitis B Vaccines. WHO Expert Committee on Biological Standardization 2010. 6

(本文于 2010 年 1 月 30 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告